

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Selektion von monoklonalen Antikörpern

Patent number: DE19900635
Publication date: 2000-07-13
Inventor: MOLDENHAUER GERHARD (DE); POUSTKA ANNEMARIE (DE); BREITLING FRANK (DE)
Applicant: DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE)
Classification:
- **international:** C07K16/00; C07K14/435; C12N15/12; C12N15/63; C12N5/10
- **european:** C07K14/315, C07K14/705W, C07K16/12A12, C07K16/18, C07K16/40
Application number: DE19991000635 19990111
Priority number(s): DE19991000635 19990111

Also published as:
 WO0042176 (A1)
 EP1141271 (A1)

Abstract of DE19900635

The present invention relates to a method for selecting monoclonal antibodies. The method comprises the fusion of B-lymphocytes with myeloma cells to form hybridome cells that produce antibodies. The antibodies are presented on the cell surface of the hybridome cells by an antibody-binding protein. The invention also relates to the binding of antibodies to antigens and to means which can be used therefor.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 199 00 635 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
C 12 N 15/12
C 12 N 15/63
C 12 N 5/10

(21) Aktenzeichen: 199 00 635.0
(22) Anmeldestag: 11. 1. 1999
(43) Offenlegungstag: 13. 7. 2000

(71) Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE	(72) Erfinder: Breitling, Frank, 69120 Heidelberg, DE; Poustka, Annemarie, 69120 Heidelberg, DE; Moldenhauer, Gerhard, 69120 Heidelberg, DE
(74) Vertreter: Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea Schüßler, 81825 München	(56) Entgegenhaltungen: J.Bacteriol. 148, 1981, S. 265-273;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Selektion von monoklonalen Antikörpern

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Mittel.

DE 199 00 635 A 1

DE 199 00 635 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern sowie hierfür verwendbare Mittel.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beruht auf einem von Köhler und Milstein entwickelten Verfahren. Nach diesem Verfahren werden B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Antikörper-produzierende Hybridomzellen erhalten werden. Ein solches Verfahren weist große Nachteile auf. Insbesondere ist es aufwendig Antikörper zu selektieren, da dies eine getrennte Kultivierung von Hybridomzellen erfordert. Letzteres führt auch dazu, daß nur eine begrenzte Zahl von Hybridomzellen erfaßt und somit auch nicht alle Antikörper selektiert werden können, was insbesondere nachteilig ist, wenn Antikörper mit höchster Affinität für ein Antigen selektiert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem monoklonale Antikörper hergestellt werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfnungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß monoklonale Antikörper auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindepoteins präsentiert werden können. Er hat erkannt, daß hiermit monoklonale Antikörper selektiert werden können, ohne daß Hybridomzellen getrennt kultiviert werden müssen. Auch hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern sowohl gegenüber einem bestimmten als auch vielen (un)bestimmten Antigenen einer Antigenbibliothek erfolgen kann. Ferner hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern auch hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen erfolgen kann.

Erfnungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern bereitzustellen. Ein solches Verfahren umfaßt die Fusionierung von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindepoteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

Der Ausdruck "B-Lymphozyten" umfaßt B-Lymphozyten jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorstufen von B-Lymphozyten sein. Ferner können die B-Lymphozyten von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Des Weiteren können die B-Lymphozyten von einem gesunden oder kranken Organismus stammen. Günstig ist es, wenn sie von einem immunisierten Organismus stammen. Besonders günstig ist es, wenn die B-Lymphozyten für humane Antikörper oder Teile davon kodieren. Handelt es sich um B-Lymphozyten aus Tieren, ist dies erreichbar, indem die Tiere für die humanen Antikörper bzw. Teile davon transgen sind. Die Herstellung solcher Tiere kann durch übliche Verfahren erfolgen, wobei sich anbietet, die Gene für die humanen Antikörper die Teile davon in embryonale Stammzellen einzuführen, aus denen dann die Tiere generiert werden. Die Bereitstellung von B-Lymphozyten und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Myelomzellen" umfaßt Myelomzellen jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorläufer von Myelomzellen sein. Ferner können die Myelomzellen von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Bevorzugte Myelomzellen sind Abkömmlinge der Maus-Stämme P3K, P3-X63.Ag8,

X63.Ag8.653, NSO/1, Sp2/O-Ag14 und F0, der Ratten-Stämme Y3-Ag1.2.3, YB2/0 und IR9834, und der menschlichen Stämme U266, SK007 und Karpas 707. Die Bereitstellung von Myelomzellen und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Antikörper-produzierende Hybridomzellen" umfaßt Zellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen und Antikörper produzieren. Es wird auf die Ausführungen hinsichtlich B-Lymphozyten und Myelomzellen entsprechend verwiesen. Hybridomzellen können tierische und/oder menschliche Nukleinsäuren bzw. Proteine aufweisen. Die Kultivierung von Hybridomzellen kann durch übliche Verfahren erfolgen. Ferner kann es günstig sein, wenn die Hybridomzellen Rekombinasen, z. B. Rag1 oder Rag2, und/oder Mutasen (über)exprimieren. Solches kann durch Transfektion der Hybridomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren erreicht werden. Der Fachmann kennt solche Expressionsvektoren.

Der Ausdruck "Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen" betrifft jegliches Verfahren, mit dem diese Zellen fusioniert werden können. Günstig ist ein Verfahren, bei dem die Zellen über Polyethylenglykol fusioniert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Bindung der Antikörper an Antigene" betrifft jegliches Verfahren, mit dem die auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen exprimierten Antikörper an Antigene binden können. Die Antigene können an Trägern, z. B. Magnetobeads, gebunden sein. Ferner können sie markiert, z. B. fluoreszenzmarkiert, sein. Als Fluoreszenzmarker bieten sich z. B. FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin an. Des Weiteren können die Antigene an Biotin gekoppelt sein. Gebundene Antigene können dann durch übliche Verfahren, z. B. FACS-Analyse, nachgewiesen werden, wodurch auch die entsprechenden Antikörper detektiert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Antikörper-Bindepotein" umfaßt jegliches Protein, das einen Antikörper binden und an der Zelloberfläche von Hybridomzellen präsentieren kann. Insbesondere kann das Protein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker aufweisen. Beispiele für ein solches Protein sind natürliche Fc-Bindepoteine, wie CD16, CD32 und CD64. Ferner kann das Protein eine Kombination aus einem Signalpeptid, einer Antikörper-Bindestelle und einem Membrananker aufweisen, die in der Natur nicht vorkommt. Eine solche Kombination kann Teile natürlicher Fc-Bindepoteine umfassen. Ferner kann sie als Signalpeptid ein solches einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, als Membrananker eine Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 und als Antikörper-Bindestelle eine Antigen-Bindungsdomäne eines bakteriellen Proteins, wie Protein A, Protein G, Protein L oder Protein LG, aufweisen. Günstig kann es sein, wenn die Kombination mehrere Signalpeptide, Antikörper-Bindestellen und/oder Membrananker aufweist. Besonders günstig kann es sein, wenn das Antikörper-Bindepotein, insbesondere die Antikörper-Bindungsdomäne der bakteriellen Proteine Codons aufweist, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind. Der Fachmann weiß, um welche Codons es sich hier handelt.

Bevorzugte Antikörper-Bindepoteine sind in den Fig. 1–3 angegeben. Das Antikörper-Bindepotein von Fig. 1 umfaßt das Signalpeptid eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, vier Antikörper-Bindungsdomänen des Proteins L und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindepoteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682–1782 angegeben. Das Antikörper-Bindepotein von Fig. 2 umfaßt das Si-

gnalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 647–1420 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 3 umfaßt das Signalpeptid des Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von PDGFR. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682–1431 angegeben. Die Antikörper-Bindestellen aller drei Antikörper-Bindeproteine weisen auf DNA-Ebene Codons auf, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind.

Ein Antikörper-Bindeprotein der Fig. 1, 2 bzw. 3 kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich durch ein oder mehrere Aminosäuren von der Aminosäuresequenz in den Fig. 1, 2 bzw. 3 unterscheidet. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Aminosäuren liegen. Allerdings hybridisiert die DNA dieses Antikörper-Bindeproteins mit der in den Fig. 1, 2 bzw. 3 angegebenen DNA. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, hin. Ferner weist das Antikörper-Bindeprotein mit der veränderten Aminosäuresequenz Gesamt- bzw. Teilefunktionen auf, die mit jenen des Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3 vergleichbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Antikörper-Bindeprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine sich durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA" umfaßt jegliche für ein Antikörper-Bindeprotein der Fig. 1, 2 bzw. 3 kodierende DNA, die mit der DNA der Fig. 1, 2 bzw. 3 hybridisiert. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Basenpaaren liegen. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein Antikörper-Bindeprotein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEFBOS, pCDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHIsNT-A.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Bevorzugte Expressionsvektoren, die eine erfindungsge-

mäße DNA enthalten, sind in den Fig. 1–3 angegeben. Es handelt sich um die Expressionsvektoren pSEX11L4, pSEX11G2* und pSEX15G2. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) am 14. Dezember 1998 hinterlegt. Im einzelnen wurde pSEX11L4 unter DSM 12580, pSEX11G2* unter DSM 12581 und pSEX15G2 unter DSM 12582 hinterlegt.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme XL-1 Blue, Top 10 F, HB101, DH5alpha, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009, die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Myelom- und Hybridomzellen sowie die Insektenzellen sf9.

Des Weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyclonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyclonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) eine eine erfindungsgemäße DNA exprimierende Zelle,
- (c) ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein,
- (d) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (e) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, Marker, Nachweisreagenzien für die Komponenten (a)–(d)

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß von Hybridomzellen produzierte Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden. Dies erfolgt über ein Antikörper-Bindeprotein. Ein solches kann über die zur Herstellung der Hybridomzellen verwendeten Myelomzellen in die Hybridomzellen eingeführt werden. Ferner kann das Antikörper-Bindeprotein über einen es kodierenden Expressionsvektor in die Hybridomzellen eingebracht werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Antikörper zu selektionieren. Dies kann ohne großen Aufwand erfolgen, da Hybridomzellen nicht getrennt kultiviert werden müssen. Vielmehr können komplexe Gemische von Hybridomzellen unmittelbar zur Selektion von Antikörpern verwendet werden. Ferner können Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen selektioniert wer-

den. Des Weiteren eignet sich die vorliegende Erfindung Antikörper von Hybridomzell-Bibliotheken nicht nur gegenüber einem bestimmten Antigen, sondern auch gegenüber vielen (un)bestimmten Antigenen von Antigen-Bibliotheken zu selektionieren.

Somit liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, mit dem u. a. die großen Zeit- und Kosten-Probleme vermieden werden können, die bei der Selektion von monoklonalen Antikörpern bisher auftraten.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt den erfundungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11L4 (Fig. 1(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 1(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 2 zeigt den erfundungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11G2 (Fig. 2(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 2(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 3 zeigt den erfundungsgemäßen Expressionsvektor pSEX15G2 (Fig. 3(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 3(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von Myelomzellen, die ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

(A) Transiente Expression

Es werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20–40 µg des erfundungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 500 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in RPMI-Medium, das 10% FCS enthält, bei 37°C und 5–7,5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid plus 25 µg/ml Ziege anti-Kalb Antikörper (FITC markiert; GAB-FITC, Dianova) inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Myelomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, die durch die transiente Expression eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche der Myelomzellen bedingt ist.

(B) Stabile Expression

Die unter (A) erhaltenen Myelomzellen werden einer 14–24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie, wie unter (A) beschrieben, mit GAB-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Myelomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Myelomzelllinie X63-Ag8.653 erhalten, die stabil ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 2

Herstellung von Hybridomzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins exprimieren

(A) Es werden 10 Balb/c-Mäuse subkutan mit je 100 µg abgetöteten Helicobacter pylori Bakterien in komplettem Freund'schen Adjuvans, das abgetötete Mycobacter tuberculosis Bakterien enthält, immunisiert. Nach 4 bzw. 7 Wochen erfolgt jeweils eine intraperitoneale Booster-Injektion mit 100 µg abgetöteter Helicobacter pylori-/Mycobacter tuberculosis-Bakterien. Den Mäusen werden vor jeder Immunisierung bzw. nach der letzten Immunisierung jeweils 100 µl Blutserum entnommen und im Westernblot wird die Antigenspezifische Immunantwort der Maus überprüft. Als Antigen wird ein Aufschluß von bakteriellem Gesamtprotein von Helicobacter pylori bzw. Mycobacter tuberculosis verwendet. Der Nachweis gebundener Maus-Antikörper wird durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper (Dianova) geführt. Mäusen mit einer deutlichen Antigen-spezifischen Immunantwort wird die Milz entnommen und die Lymphozyten werden mit Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 von Beispiel 1(B) fusioniert. Die Fusion erfolgt durch Polyethylenglykol (vgl. Goding, J. W., Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3. Auflage, (1996), Verlag Academic Press Limited, 24–28). Es werden Hybridomzellen erhalten. Diese werden 10–12 Tage in HAT-Medium bei 37°C inkubiert. Es wird die Hybridomzell-Bibliothek 2A erhalten.

Es werden Hexapeptide mit N-terminalem Biotin synthetisiert. Die Peptide entsprechen den 6C-terminalen Aminosäuren von 101 bzw. 118 Genprodukten von Helicobacter pylori bzw. Mycobacter tuberculosis. Ferner werden 103 Zellen der Hybridomzell-Bibliothek 2A mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml der vorstehenden Biotin-markierten Peptide inkubiert. Die Zellen werden mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Helicobacter pylori- bzw. Mycobacter tuberculosis-Aktivität aufweisen.

(B) Es werden Zellen der Hybridomzelllinie U98/6, die einen Maus-anti-Urokinase-Antikörper produzieren, verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20–40 µg des erfundungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 400 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in inkomplettem AIM V-Medium bei 37°C und 5–7,5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 mg/ml Urokinase-Biotin inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Urokinase-Aktivität

aufweisen.

Die erhaltenen Hybridomzellen werden einer 14–24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie erneut, wie vorstehend beschrieben mit Urokinase-Biotin und Streptavidin-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Hybridomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Hybridomzelline U98/6.3.3 erhalten, die stabil Antikörper auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 3

Selektion von monoklonalen Antikörpern, die mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen exprimiert werden

10^3 Zellen der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) werden mit 10^7 Zellen der Hybridomzelllinie DOB-L1.3 gemischt. Letztere Hybridomzelllinie produziert einen den C-Terminus der humanen HLA-DO- β -Kette erkennenden Antikörper. Dieser wird mittels des gleichen Antikörper-Bindeproteins wie in der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2(B) auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Zellgemisch wird mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml Urokinase-Biotin inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid wird das Zellgemisch in DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht in einen FACS-Sorter gegeben.

Es werden Hybridomzellen mit grüner Fluoreszenz selektioniert. In weiterführenden Untersuchungen zeigen diese eine anti-Urokinase-Aktivität. Es werden die Hybridomzellinen U98/6.3.3 51-S50 erhalten.

Beispiel 4

Herstellung und Reinigung eines erfundungsgemäßen Antikörper-Bindeproteins

(A) Die DNA von Fig. 1 zwischen den Nukleotid-Nummern 682–1782 wird mit BamHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/Antikörper-Bindeprotein erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfundungsgemäßen Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/Antikörper-Bindeprotein wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265–273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J. O. und Kornberg, R. D., J. Mol. Biol. 149 (1975), 709–733).

Es zeigt sich, daß ein erfundungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

(B) 10^8 Zellen der in Beispiel 1 (B) erhaltenen Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 werden mit PBS gewaschen, in PBS + 1% Tween 20 aufgenommen und auf Eis inkubiert. Partikuläre Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 30.000 g abgetrennt und der Überstand wird auf eine IgG Sepharose Säule (IgG Sepharose 6 Fast Flow Lab Pack von Pharmacia) gegeben. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt und das erfundungsgemäße Antikörper-Bindeprotein wird in saurem pH eluiert.

10 Nach seiner Neutralisierung wird das Antikörper-Bindeprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelectrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. vorstehend).

Es zeigte sich, daß ein erfundungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5

20 Herstellung und Nachweis eines erfundungsgemäßen Antikörpers

Ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 41 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gelstücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

35 Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freunds Adjuvans eingesetzt.

40 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freunds Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
45 Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203–209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215–229, beschrieben,

55 durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1 : 10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. 60 Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1 : 5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Bänder sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfundungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

5

Pro Immunisierung werden 40 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freunds Adjuvans eingesetzt.

10

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freunds Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freunds Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

15

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfundungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

20

Pro Immunisierung werden 12 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freunds Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

25

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freunds Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freunds Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

35

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfundungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

40

1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

45

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt.

50

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt.

55

4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.

60

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist.

65

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2–5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.

7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-

Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–8, wobei die Hybridomzellen Rag 1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5,5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.

15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, umfassend:

- (a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code verwandte DNA.

18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 17.

19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 18.

20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15 oder 16.

Hierzu 15 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

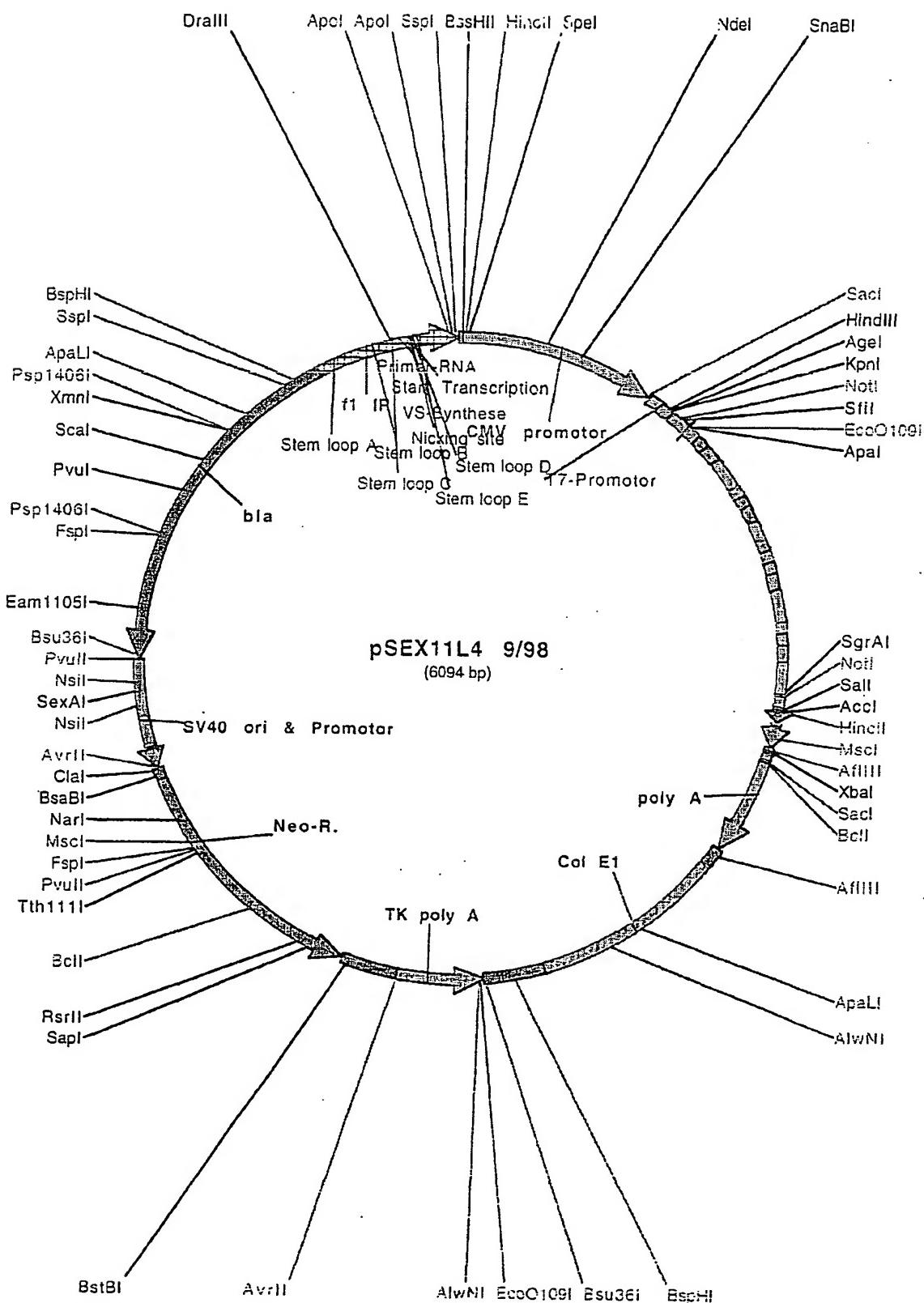


Fig. 1 (A)

Fig. 1 (B)

MscI
 1726 CGAGGCATTTCCCTTCTCGTGGCCAAATGCCGTAATCCACCTCTCTGCTTCAG1TGAGGTGACACGTCTAGA
 349 Gl yGly IlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeuPheCysPheSer •••

SacI BclI
 1801 GCTATTCTATAGTGTCACTAAATGCTAGAGCTCGTGTACAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTGTGCCAGCCATCT

poly A
 1876 GTTGTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTGACCTGGAAAGGTGCCACTCCCACTGTCTCTTAATAAAAAATGAG

 1951 GAATTGCATCGCATTGTCITGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCACGGACAGCAAGGGGAG

 2026 GATTGGGAAGACACATGCCAGGCATGCTGGGATGCCGTGGCTCATGGCTCTGAGGCCGAAGAACCAAGTGGC

AfIII
 2101 GGTAAATACGGTTATCCACAGAACATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCACCAAAAGGCCAG
 2176 GAACCGTAAAAGGCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGGCCCCCTGAGAACATCGAATTAATCGAATG

 2251 CTCTAGTCAGAGGTGCCGAAACCCGACAGGACTATTAAGATAACCAGGCCTTCCCGCTGGAAAGCTCCCTGCG

 2326 CTCTCTCTGTCGACCCCTGCCGCTAACGGATACCTGTCGGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTAA

ApaLI
 2401 TPGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGCTGTAGGTCTCGCTCCAAGCTGCCCTGCTGCTCGAACGAAACCGCCGCT

Col E1
 2476 TCAGCCCCGACCCCTGCCCTTATCCGTTACTATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGAACGACTTATGCGCT

AlwNI
 2551 GGCAGCAGCCACTGGTAACGGATTAGCAGCGAGGTATGTAGGCCGTCTACAGCTTGAAGCTCGCTGCGCC

 2626 TAATACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCCCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAAAGCT

 2701 TGGTAGCTCTGATCCGGCAACACACCCCGCTGGTACCGGTGGTTTTTTTGTGCAACGACGATTCGGCG

 2776 CAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGTATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCGC
BspHI
 2851 TTAAACGGATTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTAA
EcoO109I

Bsu36I AlwNI
 2926 ATCAAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCGGGCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCCAGCCCTGG

 3001 GCCTTCACCGAACCTGGGGGTGGGTGGGAAAAGGAAAGAAACGCCGGCGTATGGCCCCAATGGGTCTCGG

TK poly A
 3076 TGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTATGAAACAACGACCCAAACACCGTGGCTT

 3151 ATTCTGCTTTTATTGCCGTCAAGOGCGGGTTCCTCCGTATTGTCTCCCTCCGTGTTCAAGTTAGCCTCCC

AvrII
 3225 CCTAGGGTGGCGAACGAACTCCAGCATGAGATCCCCGGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCTCCCCGAAACGAT

 3301 TCCGAAGCCAAACCTTCATAGAAGGCCGGTGGAAATCGAAATCTCTGATGGCAGGTTGGCGTGGCTGGTC

 3376 GGTCATTCGAACCCAGAGTCCCGTCAGAAGAACCTGCAAGAACGAGATAGAACGGGATGGCAGGTTGGCGTGG
 263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArgGlnSerAspP
SapI
 3451 GGAGCGGGGATACCGTAAAGCACGGAGGAAGCGGTAGCCCATTGCGCCAAAGCTTTCAGCAATCAGCGTA
 2461 r oAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyLeuGluGlyLeuAlaIleAspArgThrA

 3526 GCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCAACCCAGCCGGCACAGTCGATGAAATCCAGAAAAGCGGCCATT
 2211 laLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnG

Fig. 1 (B) Fortsetzung I

3601 TCCACCATGATATTGGCAAGCAGGCATGCCATGGTCACGCGAATCTCGCCGTGCCCATGCTCGCTTG
 1961 IuValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGl yHi sThr ValVz! LcuAspGl uGl yAspP uMe SerAlaLysL
 BclI
 3676 AGCTGGCAACAGTTCGGCTGGCGAGCCCCATGCTCTTGATCATCTGATCGACAAGACGGCTTCCATC
 1711 euArgAlaPheLeuGl uAlaProAlaLeuGl yGl nHi sGl uGl nAspAspGl nAspVal LeuGl yAl aGl uMe I A
 3751 CGAGTCAGTCGCTCGATGCGATGTTGGCTGGTCAAATGGGAGGTAGCCGGATCAACGATGCAGC
 1461 r gThr ArgAlaArgGl uIleArgHisLysAlaGl nHi sAspPheProCysThr Al aProAspLeuThr Hi sLeuA
 3826 CGCCGATTCGATCACCCATGATGGTACTTCTCGGCAGGAGAACGGTAGATCACAGGAGATCCTGCCCGCC
 1211 r gArgMetAlaAspAlaMetIleSerValLysGl uAlaProAlaLeuHi sSerSerLeuLeuAspGl nGl yProV
 Tth1111 Pvull FspI
 3901 ACTTCGCCAATAGCAGGCCAGTCCTTCCCCTCAGTGACACGCTCGAGCACAGCTCGCGCAAGGAACGCCGTC
 961 al Gl uGl yLeuLeuLeuTrpAspArgGl yAl aGl uThr ValValAspLeuValAlaAlaCysProValGl yThr T
 Neo-R.
 Mscl
 3976 GTGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGAGTTCAATTAGGGCACCGGACAGGTGGCTTGACAAA
 711 hr Al aLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGl uAspGl nLeuGl uAsnLeuAlaGl ySerLeuAspThrLysValPheL
 NarI
 4051 AGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGAAACACGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGCCCCGTCA
 461 euValProArgGl yGl nAl aSerLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGl yIleThrGl nGl nAl aTrpAspT
 BsaBI
 4126 TAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGGTGAATCCATCTTGTCAATCATGGAAACGGAT
 211 y rGl yPheLeuArgGl uVal TrpAl aAl aProSerGl yAl aHi sLeuGl yAspGl nGl uIleMet
 ClaI AvrI
 4201 CCTCATCTGTCTCTTGATGATCTTGCRAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTCTGGATAG
 4276 CTCAGAGCCGAGGGCGCCCTGGCCTCTGCATAAAATAAAAAAAAAATTAGTCAGCCATGGCCGGAGATGGC

SV40 ori & Promotor

4351 GGAACCTGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGCGGAGTTAGGGCGGACTATGGTGTGCTGACTAATTGAGATGCAT NsII

4426 GCTTTGCTACTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTGCTGACTAATTGAGATGCATGCT SexAI NsII

4501 TTGCATCTCTGCCTCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTTAACTGACACACATTCCACAGCTGGTCTTT Pvull

Bsu36I
 4576 TCCGCCTCAGGACTCTCCTTTCAATAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCA 2871... Trp
 Eam1105I

4651 ATGCTTAAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTCTGCTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
 2851 HisLysIleLeuSerAlaGl yIleGl uAl aIleGl nArgAsnArgGl uAspMetThrAlaGl nSerGl yThrThr
 4726 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTSCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACC
 2601 TyrIleValValIleArgSerProLysGl yAspProGl yLeuAlaAlaIleIleGl yArgSerGl yArgGl uGl y
 4801 GGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGGCCAGCCGAAGGGCCGAGCCGAGAAGTGGCTCTGCAACTTATCCGC
 2351 Al aGl ySerLysAspAlaIlePheTrpGl yAl aProLeuAlaSerArgLeuProGl yAl aValLysAspAla
 FspI Psp1406I
 4876 CTCCATCAGTCTATTAAATTGGTGGCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTGGCAACGTTG
 2101 Gl uMetTrpAspIleLeuGl nGl nArgSerAlaLeuThrLeuLeuGl uGl yThrLeuLeuLysArgLeuThr
 4951 TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTCTACGCTCTCGTTGGTATGGCTTCAATTGCTCCGGTCCCAACGATC
 1851 Al aMetAlaValProMetThrThrAspArgGl uAspAsnProIleAlaGl uAsnLeuGl uProGl uTrpArgAsp
 Pvul
 5026 AAGGGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGGGTAGCTCCTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAG
 1601 LeuArgThrValHi sAspGl yMetAsnHisLeuPheAlaThrLeuGl uLysProGl yGl yIleThrThrLeuLeu
 5101 TAAGTTGCCAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACTGCTATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG
 1351 LeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMetThrIleAlaAlaSerCysLeuGl uArgValThrMetGl yAspThrLeu
 bIa Scal
 5176 ATGCTTCTCTGTGACTGGTCACTACTCAACCAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGCCACCGAGTTCCCTTG
 1101 HisLysGl uThrValProSerTyrGl uValLeuAspAsnGl nSerTyrHisIleArgArgGl yLeuGl nGl uGl n Fsp1406I
 XmnI
 5251 CCCGGCGTCATAACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGGTCACTATTGAAAACGTTCTTC
 851 Gl yAl aAspIleArgSerLeuValAlaGl yCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMetProPheArgGl uGl u

Fig. 1 (B) Fortsetzung II

ApaI

5326 GGGCGAAA ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCACTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCAACTGATC
 60 Pro Arg Phe Ser Gl u Leu Ile Lys Gl y Ser Asn Leu Asp Leu Gl u Ile Tyr Gl y Val Arg Al a Gl y Leu Gl n Asp
 5401 TTCAAGCATCTTTACTTTACCCAGCGTTCTGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAATGCCGAAAAAGGAAAT
 35 Gl u Al a Asp Lys Val Lys Val Leu Thr Gl u Pro His Al a Phe Val Pro Leu Cys Phe Al a Al a Phe Phe Pro Ile
 SspI

5476 AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG
 10 Leu Al a Val Arg Phe His Gl n Ile Ser Met
 BspHI

5551 TCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAAA

Stem loop A

5626 AGTGCCACCTGACGCCCTGTAGCGGCCATTAGCGCCGGGGTGTGTGGTTACCGCAGCGTACCGCTACCGCTAC

5701 ACTTGCCAGGCCCTAGCGCCCGCTCTTCGCTTCTTCCCTTCTCGCACGTTGCCCGCCCTTCCCGCC

f1 IR Stem loop B

5776 TCGACCTCTAATTCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTCAGCTTTACGGCACCTCGACCCCGAAAGCTTGA

Start Tran:
VS-Synthese

DraIII Stem loop C Primer-RNA

5851 TTAGGGCTGATGGTTACGTAGTGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTACGTTGGACTTCGTT

Nicking site Stem loop D Stem loop E

5926 CTTTATATGGAATCTTGTCCAATCTGGAAACAAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGG

Apol Apol SspI

6001 GATTTTGCCGATTTGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTACAAATTTAACGGGAAATTAAACAAAT

6076 ATTAACGCTTACAATTAC

Fig. 1 (B) Fortsetzung III

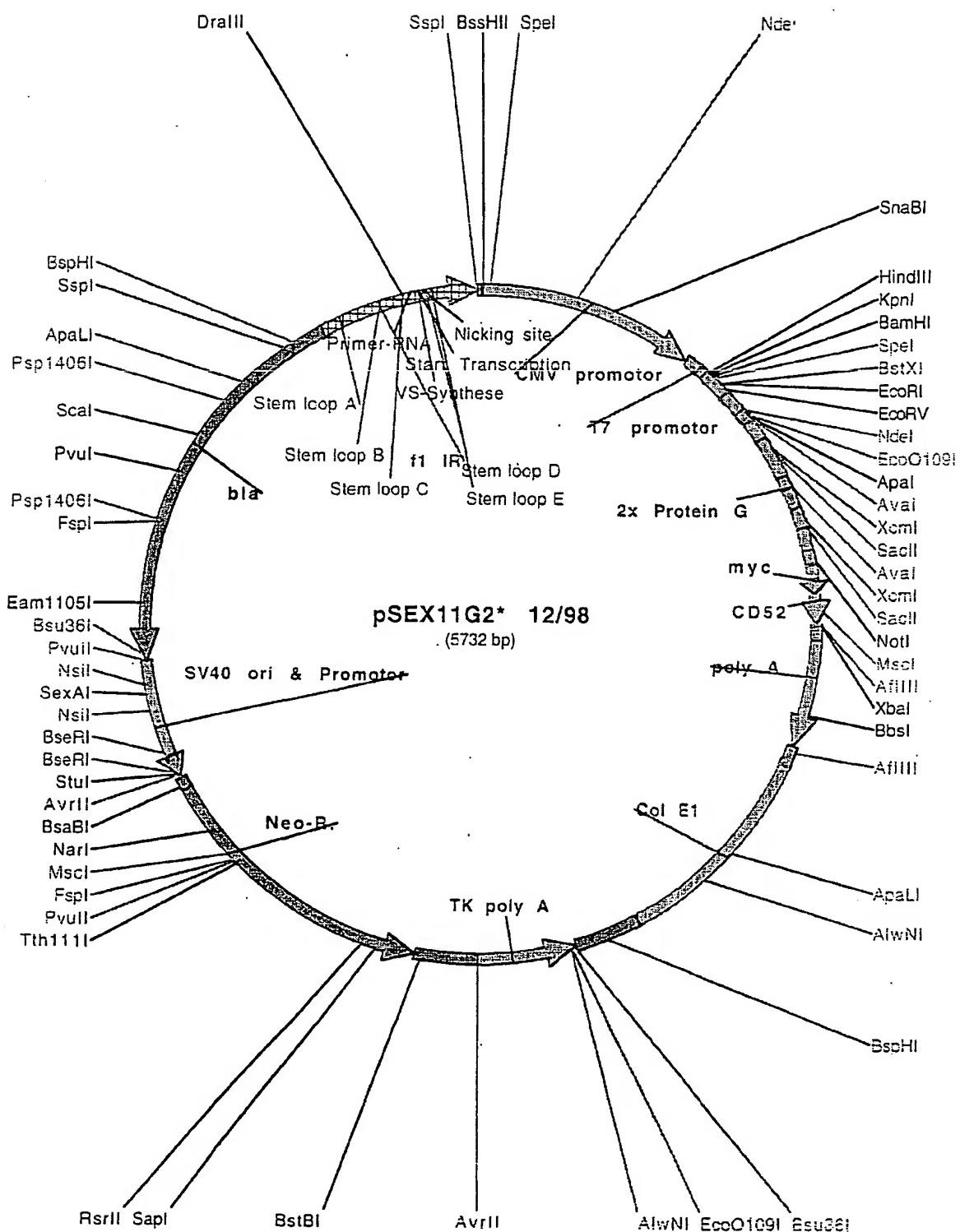


Fig. 2 (A)

Fig. 2 (B)

AflIIIXbaI

1426 TGACACGTCTAGAGCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAG

poly A

1501 TTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTC

1576 CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGCTGGGCAAGGA

BbsI

1651 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAGACAAATGCCAGGCATGCTGGGATCCGGTGGCTCTATGGCTCTGAGGGGA

AflII

1726 AAGAACCACTGGCGGTATACGGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC

1801 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAGGATATC

1876 ACATTTATCCACCCCTCAAGTCAGAGGTGGCAACCCGACACGGACTATTAAGATAACAGGGTTTCCGTTGAA

1951 GCTCCCTCTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATAACCTCTCCGCTTCTCCCTTCCGAAACCG

Apal

2026 TGGCGCTTTCTCATAGCTCAGGCTGTAGGTATCTCAGTTGGTGTAGGTGTTGCTCCAAGCTGGGTGTGTC

Col E1

2101 ACGAACCCCCCGTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGAACAG

AIwNI

2176 ACTTATCGCCACTGGCGAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAAGGGGTGCTAACGAGTTCT

2251 TGAAGCTGGTGGCCTAATACCGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGGCTCTGCTGAGGCTTTAACCT

2326 TCGGAATGGAGGTGGTAGCTCTGATCCGCAAAACAAACCCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTGCAAGC

2401 ACCAGATTACCGCCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGTATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAA

BspHI

2476 ACGAAAACCTACGTTAAGGGATTGGTCATGAGATTATCAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAAA

EcoO109I**Bsu36I****AIwNI**

2551 AATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCGGGCTGCGCCCCGACGTTGG

2626 CTGGGAGCCCTGGCCTTCACCGAACCTGGGGGTCCGGTGGGAAAAGGAAGAAACGGGGCGTATTGGCCCC

TK poly A

2701 AATGGGGTCTCGGTGGGTATGGACAGACTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGTTATGAACAAACGACCCAA

2776 CACCGTGGTTTCTCTGCTTTTATTGCCGTATAGCGGGGTTCTICGGTATTGTCTCCCTCCGTT

AvrII

2851 CAGTTAGCCCTCCCCCTAGGGTGGCGAAGAACCTCCAGCATGAGATCCCCGGCTGGAGGATCATCCAGGGCGT

2926 CCCGGAAAACGATTCCGAAGCCAACCTTCATAGAAGGCCGGTGAATCGAAATCTGTGATGGCAGGTGG

BstBI

3001 GCGTCGCTGGTCGGTCATTGCAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACCTCGTCAAGAAGGCATAGAAGGCAT
2631 PhePheGl uAspLeuLeuArgTyrPheAl alle

SapI

3075 GCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCAGCAGGAGCCGTCAGCCCATTGGCCGCCAGCTCTCAGC

2511 ArgGl nSerAspProAl aAl alleGl y TyrLeuValLeuPheArgAspAl aTrpGl uGl yGl yLeuGl uAl a

RsrII

3151 AATATCAGGGTAGCCPACGCTATGCTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCAGCTCTCAGC

2261 IleAspArgThrAl aLeuAl alleAspGl nTyrArgAspAl aValGl yLeuArgGl yCysAspI IlePheGl ySer

3226 AAAGCCGCATTTCCACCATGATATTGGCAAGCAGGCATGCCATGGGTACCGACGAGATCCTGCCGTGGG

2011 PheArgGl yAsnGl uValMetI IleAsnProLeuCysAl aAspGl yHi sThr Val Val LeuAspGl uGl yAspPro

3301 CATGCTCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGAGCCCTGCTCTTGATCATCTGATCGACAAG
 1764 Met Ser Al aLysLeuArgAl aPheLeuGl uAl aProAl aLeuGl yGl nHi sGl uGi nAspAspGl nAspVal Leu
 3376 ACCGGCTTCCATCCGACTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTGCTGGTGGTCGAATGGCAGGTAGCCGGATC
 1514 Gl yAl aGl uMet ArgThr ArgAl aArgGl uLleArgHi sLysAl aGl nHi sAspPheProCysThr Al aProAsp
 3451 AAGCGTATGCAGCCGCCATTGCATGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGCCAAAGGTGAGATCACAGGAG
 1264 LeuThr Hi sLeuArgArgMetAl aAspAl aMet LleSer Val LysGl uAl aProAl aLeuHi sSer Ser LeuLeu
 FspI
 Tth111I PvuII
 3526 ATCCCTCCCCGGCACTTCCGGCAATAGCAGCCAGTCCCTCCGGCTTCAGTGACAACTGCGAGCACAGCTGCGCA
 1014 AspGl nGl yProVal Gl uGl yLeuLeuLeuTrpAspArgGl yAl aGl uThr Val Val AspLeuVal Al aAl aCys
 Neo-R.
 MscI
 3601 AGGAACGCCCGTCGTGGOCAGCCACGATAGCCGCTGCCCTCGTCTTGCAGTTCACTCAGGGCACCCACAGCTC
 764 ProVal Gl yThr Thr Al aLeuTrpSer LeuArgAl aAl aGl uAspGl nLeuGl uAsnLeuAl aGl ySer LeuAsp
 NarI
 3676 GGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGAACACGGCGCATCAGAGCACCCGATTGCTG
 514 Thr LysVal PheLeuVal ProArgGl yGl nAl aSer LeuArgPheVal Al aAl aAspSer CysGl yLleThr Gl n
 3751 TGTGCCCAGTCATGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGGGGAGAACCTGCGTCAATCCATCTTGTCAAT
 264 Gl nAl aTrpAspTyrGl yPheLeuArgGl uVal TrpAl aAl aProSer Gl yAl aHi sLeuGl yAspGl nGl uLle
 StuI
 BsaBI AvrII BseRI
 3826 CATGCGAAACGATCCTCATCCTGCTCTTGATCTTGCATAGCCCTCCAAAGCTAGCCCTCCAAAGCTCCAAAT
 14 Met
 BseRI
 3901 ACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCAGGGAGGCCCTGGCCTCTGCATAAATTAATTAATTAATGCTAGCCATGG
 —
 SV40 ori & Promotor
 3976 GCGGAGAATGGGGGAACTGGGGAGTTAGGGGGATGGGGAGTTAGGGGGGGACTATGGTTGCTGACT
 —
 NsiI SexAI
 4051 AATTGAGATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTTAATGACACACATTC
 —
 NsiI
 4126 TGAGATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTTAATGACACACATTC
 —
 PvuII Bsu36I
 4201 ACAGCTGGTTCTTCCGCTCAGGACTCTTCTTTCAATAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGT
 —
 4276 CTGACAGTTACCAATGCTTAATCACTGAGGCACCTATCTCAGGCACTGCTATTTCTCATCCATAGCTGCCT
 2874 T TrpHi sLysLleLeuSer Al aGl yLleGl uAl aLleGl nArgAsnArgGl uAspMet Thr Al aGl
 Eam1105I
 4351 GACTCCCCGTCGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCGCGAG
 2644 nSer Gl yThr Thr TyrLleValValLleArgSer ProLysGl yAspProGl yLeuAl aAl aLleLleGl yA rgSe
 4426 ACCCACGCTCACCGGCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGGCCAGGGCCAGGCCAGAACGTGGTCTG
 2394 r Gl yA rgGl uGl yAl aGl ySer LysAspAl aLlePheTrpGl yAl aProLeuAl aSer ArgLeuLeuProGl yAl
 4501 CAACTTATCCGCTCCATCCAGCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCAGTTAATAGTT
 2144 aVal LysAspAl aGl uMet TrpAspLleLeuGl nGl nArgSer Al aLeuThr LeuLeuGl uGl yThr LeuLeuLy
 FspI Psp1406I
 4576 TGGCAACGTTGTCAGGCTATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTCGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG
 1894 sArgLeuThr Thr Al aMet Al aVal ProMet Thr ThrAspArgGl uAspAsnProLleAl aGl uAsnLeuGl uPr
 —
 PvuI
 4651 GTTCCCAACGATCAAGGGAGTTACATGATCCCCATGTTGTCAGGTTAGCTCCCTGGTCTCCG
 1644 oGl uTrpArgAspLeuArgThr Val Hi sAspGl yMetAsnHi sLeuPheAl aThr LeuGl uLysProGl yGl yLle
 4726 TCGTTGTCAGAAGTAAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC
 1394 eThr Thr LeuLeuLeuAsnAl aAl aThr AsnAspSer Met Thr LleAl aAl aSer CysLeuGl uArgVal Thr Me
 bla Scal
 4801 TGCCATCCGTAAGATGCTTCTGACTGGTGAATCTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGTGTATGGGGGAC
 1144 t Gl yAspThr LeuHi sLysGl uThr Val ProSer TyrGl uVal LeuAspAsnGl nSer TyrHi sLleArgArgGl
 4876 CGAGTTGCTCTTGCCTGGCGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCTG
 894 yLeuGl nGl uGl yAl aAspLleArgSer LeuVal Al aGl yCysLeuLeuVal LysPheThr Ser Met Met Pr
 Psp1406I
 4951 GAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG
 644 oPheArgGl uGl uProArgPheSer Gl uLeuLleLysGl ySerAsnLeuAspLeuGl uLleTyrGl yVal A rgAl

Fig. 2 (B) Fortsetzung II

5026 CACCCA ACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTGTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCG
 39 ▲ aGl yLeuGl nAspGl uAl aAspLysVal LysVal LeuThr G! uP roHi sAl aPheVal PheLeuCysPheAl aAl
 SspI
 5101 CAAAAAAAGGCAATAAGGGGCACACGGAAATGTTGAATACTCTACTCTTCCTTTCAATATTATTGAAGCATT
 14 ▲ aPhePhePheProleLeuAl aValA rgPheHi sGl n l eSer Met
 BspHI
 5176 ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGTTCCGGCA
 5251 CATTTCCCCCAAAAGTGCCACCTGAGCGCCCTGTAGCGGGCGATTAGCCGGGGGGTGTGGTGTACGGCA

Stem loop A

5326 GCGTGACCCCTACATTGCCAGGCCCTAGGCCCGCTCCTTCGCTTCTTCCCTTCTGCCACGTTG

f1 IR

Stem loop B

5401 CCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTACGGTICCGATTTAGTCTTACGGCACCTCGACC

DraIII

Stem loop C

Primer-RNA

5476 CCAAA~~AA~~ACTTGTAGGGTGATGGTACGTAGTGGCCATGCCCTGATAGACGCTTTTGGCCTTAAAGT

Start Transcription

VS-Synthese Nicking site Stem loop D

Stem loop E

5551 TGGAGTCCACGGTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACCAACTCAACCTATCTGGCTTAATTGTT

5626 TTGATTTATAAGGGATTTTGGCATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGACGCTGATTAAACAAATTTAACGGA

SspI

5701 ATTTAACAAAATATTAACCCCTACAATTAC

Fig. 2 (B) Fortsetzung III

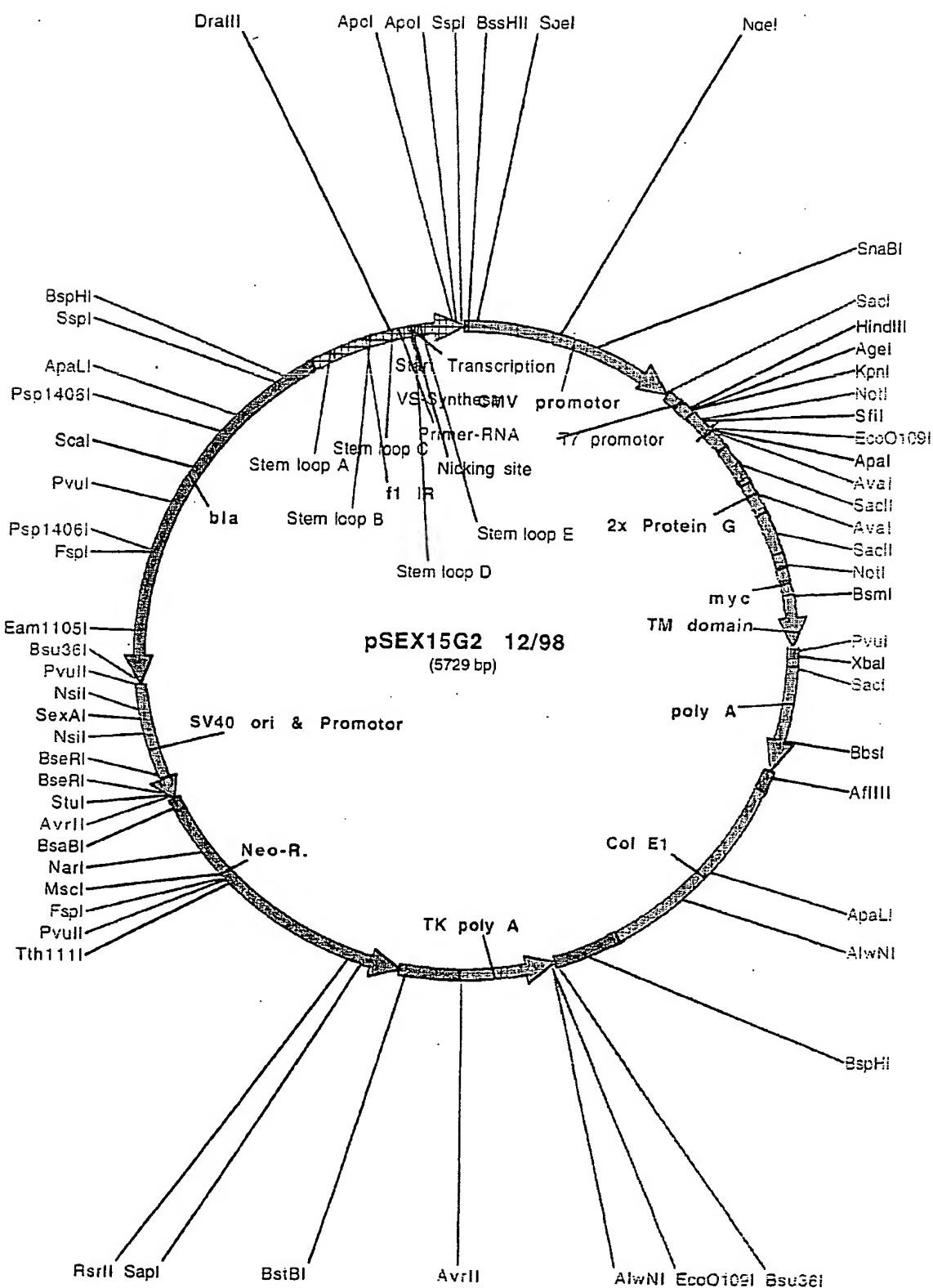


Fig. 3 (A)

Fig. 3 (B)

Fig. 3 (B) Fortsetzung I

3301 GCTCGCCCTTGAGCGAACAGTTCGGCTGGCGAGCCCCCTG TGCTCTGATCGACAAAGACC
 175⁴ Ser Al aLysLeuArgAl aPheLeuGl uAl aProAl aLeuGl yGl nHi sGl tGl nAspAspCl nAspVal LeuGl y
 3376 GGCTTCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGAICCGATGTTCCGCTGGTGAATGGGCAGGTAGCCCGATCAAG
 150⁴ Al aGl uMet A ArgThr ArgAl aArgGl uLysLeuAl aGl nHi sAspPheProCysThr Al aProAspLeu
 3451 CGTATGCCAGCCGCCATTGATCATGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATC
 125⁴ Thr Hi sLeuArgArgMetAl aAspAl aMet lLeSer Val LysGl uAl aProAl aLeuHi sSer Ser LeuLeuAsp
 Tth1111 PvullFspI
 3526 CTGCCCCGGCACTTCGCCCATAAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACTGCGAGCACAGCTGCCAAGG
 100⁴ Gl nGl yProVal Gl uGl yLeuLeuLeuTrpAspArgGl yAl aGl uThr Val Val AspLeuVal Al aAl aCysPro
 Neo-R.
 MscI
 3601 AACGCCGCTGCGCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCCTCGCTTGAGTTCAATTAGGGCACCGCACGGTCCGT
 75⁴ Val Gl yThr Thr Al aLeuTrpSer LeuArgAl aAl aGl uAspGl nLeuGl uAsnLeuAl aGl ySer LeuAspThr
 NarI
 3676 CTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGAAACACGGCGGATCAGAGCAGCCGTTGCTGTTG
 50⁴ LysVal PheLeuVal ProArgGl yGl nAl aSer LeuArgPheVal Al aAl aAspSer CysGl y lLeThr Gl nGl n
 3751 TGCCCACTAGCCATAAGCCTCTCCACCCAGCGCCGGAGAACCTGCGTGAATCCATCTGTTCAATCAT
 25⁴ Al aTrpAspTyrGl yPheLeuArgGl uVal TrpAl aAl aProSer Gl yAl aHi sLeuGl yAspGl nGl uLleMet
 StuI
 BsaBI AvrII BseRI
 3825 GCGAAACGATCCTCATCCTGTCCTGATCGATCTTGCAGCTAGGCTCCAAAAAGCCTCCACTACT
 BseRI
 3901 TCTGGAAATAGCTCAGAGGCCGAGGGGGCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCG

SV40 ori & Promotor

3975 GAGAATGGCGGAACCTGGCGGAGTTAGGGCGGATGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGGCTGCTGACTAAT
 NsiI SexAI
 4051 TGCGATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTGGTGTGACTAATTGA
 NsiI Pvull
 4126 GATGCATGCTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGACTTTCCACACCTAACTGACACACATTCCACA
 Bsu36I
 4201 GCTGGTTCTTCGCCCTCAGGACTCTCCCTTTCAATAAACTCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGCTG
 Eam111
 4276 ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGCTTCATCCATAGTGCCTGAC
 287⁴ TrpHi sLys lLeLeuSer Al aGl y lLeGl uAl a lLeGl nArgAsnArgGl uAspMet Thr Al aGl nSe
 4351 TCCCCGTCGTGAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAGTGCCTGAATGATACCCGAGACC
 263⁴ r Gl yThr Thr Tyr lLeVal Val lLeArgSer ProLysGl yAspProGl yLeuAl aAl a lLe lLeGl yA rgSer Gl
 4426 CACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAACCAGCCAGCCAGGGCAGCGCAGAAGTGGCTCTGC
 238⁴ yA rgGl uGl yAl aGl ySer LysAspAl a lLePheTrpGl yAl aProLeuAl aSer ArgLeuLeuProGl yAl aVa
 FspI
 4501 CTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGGCGGGAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCCAGTTAATAGTTGC
 213⁴ LysAspAl aGl uMet TrpAsp lLeLeuGl nGl nArgSer Al aLeuThr LeuLeuGl uGl yThr LeuLeuLysAr
 Psp1406I
 4576 GCAACGTGTTGCCATGCTACAGGCATCGCTGTACGGCTCGTGTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT
 188⁴ gLeuThr Thr Al aMet Al aVal ProMet Thr Thr AspArgGl uAspAsnPro lLeAl aGl uAsnLeuGl uProGl
 Pvul
 4651 CCCAACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGTGAAAAAGCGGGTAGCTCCTCGGTCTCCGATCG
 163⁴ uTrpArgAspLeuArgThr Val Hi sAspGl yMetAsnHi sLeuPheAl aThr LeuGl uLysProGl yGl y lLeTh
 4726 TTGTCAAGAAGTAAAGTGGCCCGAGTGTATCTCATGGTTATGGCAGCAGTCATAATTCTCTACTGTCATGC
 138⁴ r Thr LeuLeuLeuAsnAl aAl aThr AsnAspSer Met Thr lLeAl aAl aSer CysLeuGl uArgVal Thr Met Gl
 bIa Scal
 4801 CATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTAGTACTCACCAACTCATTCGAGAAATAGTGTATGGCGGAGCCGA
 113⁴ yAspThr LeuHi sLysGl uThr Val ProSer TyrGl uVal LeuAspAsnGl nSer TyrHi s lLeArgArgGl yLe
 4876 GTTGCTCTGCCCGCCATACGGATAATACCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGCCTCATCATTGGAA
 88⁴ uGl nGl uGl nGl yAl aAsp lLeArgSer LeuVal Al aGl yCysLeuLeuVal LysPheThr Ser Met Met ProPh
 Psp1406I ApaLI
 4951 AACGTTCTCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTGTAACTCTGTC
 63⁴ eArgGl uGl uProArgPheSer Gl uLeu lLeLysGl ySerAsnLeuAspLeuGl u lLeTyrGl yVal A rgAl aGl

Fig. 3 (B) Fortsetzung II

5026 CCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTACCCAGCGTTCTGGTG-AGC>AA>AC>AGCAAGCC>>ATGCCCAA
 384 yLeuGl nAspGl uAl aAspLy sVal lLysVal LeuThr Gl uProHi sAl aPh cVa :? ProLeuCysFheAl aAl aPh
 SspI

5101 AAAAGGGAATAAGGGGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCATATTATTGAAGCATTATC
 134 ePhePro lLeuAl aVal A rgPheHi sGl n lLeSer Met

BspHI

5176 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT

5251 TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGGGCCCCTGACGGGCGCATTAAGCCGGGGGTGTGGTGGTTACGGGCGAGCG

Stem loop A

5326 TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCCTTCGCTTCTCCCTCCTTGCGCCACGTTGGCG

f1 IR

Stem loop B

5401 GCCTTCCCCGTCAAAGCTCTAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGCTGCTTACGGCACCTCGACCGCCA

DraIII

Stem loop C

Primer-RNA

5476 APPAACCTGATTAGGGTGAATGGTACACCTACTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTTGGCCCTTGACGGTTCG

Start Transcription

VS-Synthese Nicking site Stem loop D

Stem loop E

5551 AGTCCACGGTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCAAACCTGGAACAAACACTCAACCCTATCTGGGTTATTTTTC

Apol

Apol

5626 ATTTATAAGGGTTTGGCATTTGGCTATTCGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAATTTAACGGAAATT

SspI

5701 TTAACAAAATTTAACGCTTACAATTAC

Fig. 3 (B) Fortsetzung III